Lambda Cell Tray (LCT) 取扱説明書

2004.10.14 改訂

注：この取扱説明書は、英文添付文書の簡易訳です。補助用ですので、正確には英文添付文書もあわせてご覧ください。

概　要

LCT トレーは、DMSO 含有 McCoy's に懸濁したリンパ球（Class 1 は T リンパ球、Class 2 は B リンパ球）を各ウェルに約１μL ずつのせて、凍結したものです。LCT1W（通称：ウォッシュタイプ）は、OneLambda 独自の凍結メディウムを用い、リンパ球の Viability をより高く保つよう改良した製品です（アメリカ国外のユーザーには、輸送時の Viability 低下を考慮して、ウォッシュタイプをお薦めしています)。各ウェルには 3000-5000 個のリンパ球がのっており、蒸発を防ぐため各ウェルの表面にはミネラルオイル 5μL が重層されています。各トレーのパネル情報についてはワークシートをご参照ください。
OneLambda 社ホームページ（LCT Product documentation のページ）
http://128.121.57.25/product/productattach.asp?productid=34

保存方法

- 30ABC、30D、60ABC、72ABC は、－65℃のフリーザーの底（できるだけ物の出し入れが少ないところ）で 2 週間まで、あるいは液体窒素の上層で 3 ヶ月まで保存できます。
- 1W30、1W60 は、－65℃またはそれ以下のフリーザーの底（できるだけ物の出し入れが少ないところ）で有効期限まで保存可能（通常は約 6 ヶ月間)。液体窒素では保存しないで下さい。
- 何らかのアクシデントで一度解凍されてしまったトレーは使用できません。
- バクテリアの増殖やCO_2によるpH変化により、Mediumの色が黄色に変色したトレーは使用できません。

試薬プロトコル　＊1 回の処理は最大 5 枚までにしてください

Class1

1．トレーを 37℃で 2-5 分解凍する。このとき、小さな氷のかけらが残る位を目安にする。ウォッシュタイプトレー（LCT1W30、LCT1W60）は、37℃で 5 分間正確に測って解凍する。

2．20-25℃の 5% HIFCS 入り McCoy's 5A （RPMI でも可）20μL を各ウェルに加え、フリックしてメディウムを除く。ウォッシュタイプトレー（LCT1W30、LCT1W60）は、37℃の 5% HIFCS 入り McCoy's 5A （RPMI でも可）20μL を各ウェルに加え、20-25℃で 5-10 分間インキュベートした後に、フリックしてメディウムを除く。

NOTE：

- メディウムや試薬をウェルに加える時は、6 連シリンジディスペンサー*を用いてソフトドロップで加えるようにしてください。液が勢いよくウェルに当たってしまうと（例えばラムダジェットを使用してしまった場合など)、細胞が舞い散ってフリックの際にロスしてしまうなどの失敗の原因になります。6 連シリンジディスペンサーを使用するにあたっては、まずはじめに 1.5cmくらいエアーを吸ってからメディウムや試薬を吸うようにします（こうすることで最も良い状態のソフトドロップになります)。＊テラサキトレー用の特殊なディスペンサーです。詳しくはお問い合わせください。
- フリックのしかたは、右利きの場合、トレーを右手で下から持って構え、手首のスナップを効かせて時計と反対回りの弧を描くように腕を振り下ろしてフリックします。DMSO をしっかり除かないと、Viability が低下し、False Positive の原因になります。

株式会社ベリタス
〒105-0001　東京都港区虎ノ門 2－7－14　八洲ビル 3F
TEL 03-3593-3211　FAX 03-3593-3216

３．オイルロボットあるいは 6 連シリンジディスペンサーを使用して、ミネラルオイルを 5μL 各ウェルに加える（Viability を保つのに重要です）。

４．コントロールウェル以外のウェルに、検体血清 1μL を加える。コントロールウェルには、5% HIFCS 入り McCoy's 5A を 1μL 加える。コントロールウェルには、絶対に検体血清を入れないでください。

５．ジェネレーター（あるいはワイヤー）でミックスする。

６．20-25℃で 30 分間インキュベートする。

７．ABC ウサギ補体 5μL を各ウェルに加える（OneLambda のウサギ補体を使用してください (Cat. CABC-5)。他社のものは細胞毒性がある可能性があります。また、補体は使用まで氷上で冷やしておく）。

８．20-25℃で 1 時間インキュベートする。

９．各ウェルに FluoroQuench AO/EB (Cat. FQAE-100) 5μL を加える。
（エオジン染色もできます。詳しくは英文取扱説明書をご参照ください。）

１０．　Terasaki Insta-Seal (Cat. TIS250U) でトレーにふたをし、リンパ球をウェルの底に沈殿させるため、室温で 15 分間静置してから顕微鏡で観察する。染色後のトレーは、エオジン染色のものは 2-5℃で 2 週間、蛍光染色のものは遮光して 2-5℃で 2 日間保存できます。

Class 2

１．上記 Class 1 プロトコルの 1－5 を行う。

２．37℃で１時間インキュベートする。

３．DR ウサギ補体 5μL を各ウェルに加え、室温（20-25℃）で 2 時間インキュベートする。（OneLambda のウサギ補体を使用してください（Cat. CDR-5）。他社のものは細胞毒性がある可能性があります）。

４．上記 Class 1 プロトコルの 9－10 を行う。

<u>蛍光顕微鏡観察</u>

FluoroQuench AO/EB で蛍光染色を行った場合、蛍光顕微鏡で、死細胞は赤色（＝Positive）、生細胞は緑色（＝Negative）に見えます。
スコアをワークシートに記録し、マニュアル方式または OneLambda LAT/LCT Analysis Software を用いて解析を行います。

株式会社ベリタス
〒105-0001　東京都港区虎ノ門 2－7－14　八洲ビル 3F
TEL 03-3593-3211　FAX 03-3593-3216